

大黒鼠脳組織呼吸の活性化エネルギー

第 3 篇

未処置大黒鼠全脳ホモジネート呼吸酵素系の活性化
エネルギーに及ぼす Chlorpromazin 添加の影響

岡山大学医学部神経精神医学教室 (主任: 奥村教授)

薄 井 省 吾

〔昭和 32 年 9 月 12 日受稿〕

結 言

わたくしは第 1 篇において未処置大黒鼠全脳ホモジネート呼吸酵素系の活性化エネルギーを測定し、前篇においてその値におよぼす NaCN 添加の影響を調べ、得られた値についてその意義を検討し、無添加時の活性化エネルギー約 11000 cal. が NaCN 4×10^{-4} M の添加により、約 15800 cal. に転換し、これはチトクローム・チトクローム酸化酵素系が律速反応となつた為であろうと推論した。本篇において、いわゆる冬眠麻酔の主剤として外科領域において、また婦人科、内科その他の諸領域においても広範囲に使用され、精神科領域においては内因性精神病の原因療法としての期待は持ち得ないとしても、治療への応用価値という点では、きわめて重要な薬品であり、現在生化学的研究が盛に行われており、作用機序の解明にはほど遠いにしても、注目すべき研究もかなり多い Chlorpromazin (C.P.) の適当な濃度のものを添加し、それが活性化エネルギーに与える影響とその意義について検討を加えて見たい。

算出方法：第 1 篇に記載したとおりである。

実験方法：

大体第 1 篇において述べた通りであるが特に注意すべき点だけ記載する事とする。

検圧計容器内容はつぎの通りである。

主室：大黒鼠全脳の 0.2% 葡萄糖加 Krebs-Ringer 磷酸緩衝液による約 15 倍ホモ

ジネート 2 ml.

副室：20% KOH 0.2 ml.

側室：C.P. の 0.9% NaCl 溶液 0.4 ml.

(添加後の濃度が 1.5×10^{-4} M になるようにした。此の程度の添加は pH に殆んど影響しないものである。)

気相：空気。

(註) この実験に用いられた C.P. は塩野義製薬提供の Rhone-Poulenc 製薬製の前試料である。C.P. の濃度を定める為に予備実験として、pH を殆んど変化させない範囲内で、種々の濃度の C.P. の添加を行っているが、その結果は大体北大佐竹等の成績と一致し、 1×10^{-4} M 以上 1.7×10^{-4} M 位までは大体 10~40%、平均 20%~30% の酸素吸収量減少を示したので、この内 1.5×10^{-4} M という濃度を採用したものである。

このさい同一の大黒鼠について第 1 篇に記載した容器内容のもの、すなわち C.P. (一) の系を同時に対照として測定しており、その成績が第 1 篇の表 4, 表 5, 表 9, 表 10, 図 5, 図 6 であり、図 6 より算出された μ の値が約 10500 cal. であつた。0.9% NaCl 0.4 ml の添加の有無は酸素吸収量に影響しない事が、予備実験で確めてあり、第 1 篇の系は側室 (一) であるが、本篇の真の対照と見做し得る。本篇においてもできる限り複試験を用いて成績の正確さを期した事は云うまでもない。

試料の調製、第1篇に述べたと全く同一。

実験成績

C. P. $\times 1.5 \times 10^{-4}M$ を添加した場合、 38° ,

34° , $30^\circ C$ 及び 38° , 36° , $32^\circ C$ の夫々1連の3温度においての酸素吸収量を表示すれば、表1、表2のごとくである。

この際30分以後の酸素吸収量低下率が、各

表1 C. P. $1.5 \times 10^{-4}M$ 添加した時の酸素吸収量

| | □ | | | △ | | | ■ | | | ● | | | ○ | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 38°C | 34°C | 30°C | 38°C | 34°C | 30°C | 38°C | 34°C | 30°C | 38°C | 34°C | 30°C | 38°C | 34°C | 30°C |
| 10' | 20.9 | 15.3 | 13.1 | 15.3 | 11.9 | 9.3 | 19.8 | 14.1 | 12.6 | 19.3 | 14.7 | 11.9 | 17.1 | 12.4 | 11.8 |
| 20' | 41.5 | 30.7 | 24.3 | 33.1 | 23.2 | 18.1 | 37.7 | 29.5 | 24.9 | 37.8 | 28.9 | 23.2 | 32.4 | 22.8 | 19.7 |
| 30' | 59.8 | 47.8 | 37.4 | 51.5 | 36.1 | 29.8 | 57.6 | 44.7 | 37.9 | 58.6 | 42.9 | 33.6 | 51.6 | 37.6 | 31.8 |
| 40' | 80.3 | 62.5 | 48.2 | 66.2 | 46.3 | 37.9 | 76.1 | 58.9 | 49.5 | 76.5 | 56.2 | 44.9 | 66.8 | 47.3 | 40.3 |
| 50' | 99.7 | 76.2 | 59.5 | 81.9 | 57.2 | 45.7 | 93.2 | 71.8 | 60.7 | 93.9 | 69.3 | 53.7 | 82.2 | 57.5 | 48.6 |
| 60' | 117.4 | 89.8 | 70.9 | 96.7 | 67.8 | 54.2 | 111.5 | 86.6 | 72.1 | 112.9 | 82.8 | 76.3 | 96.9 | 69.9 | 58.9 |
| 平均速度 V ($\mu l/min$) | 2.037 | 1.563 | 1.247 | 1.665 | 1.187 | 0.953 | 1.918 | 1.471 | 1.257 | 1.928 | 1.442 | 1.145 | 1.685 | 1.213 | 1.038 |

□, △, ■, ●, ○は夫々異なる大黒鼠を示す符号で、第1篇の表4の同一符号の示す大黒鼠と同一である。 V ($\mu l/min$) は 0'~30' 間の平均酸素吸収速度。

表2 C. P. $1.5 \times 10^{-4}M$ 添加した時の酸素吸収量

| | × | | | ※ | | | ▲ | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 38°C | 36°C | 32°C | 38°C | 36°C | 32°C | 38°C | 36°C | 32°C |
| 10' | 20.3 | 17.9 | 14.5 | 17.6 | 16.1 | 11.8 | 19.7 | 17.1 | 14.5 |
| 20' | 43.9 | 38.7 | 30.8 | 37.3 | 30.7 | 23.9 | 41.4 | 36.4 | 27.8 |
| 30' | 66.8 | 56.5 | 46.0 | 53.2 | 45.2 | 38.3 | 63.8 | 54.2 | 44.5 |
| 40' | 87.5 | 74.8 | 60.2 | 71.4 | 61.2 | 49.5 | 83.6 | 70.3 | 57.3 |
| 50' | 108.1 | 92.6 | 74.9 | 88.7 | 73.4 | 60.7 | 105.2 | 86.5 | 71.9 |
| 60' | 127.4 | 110.3 | 88.2 | 107.5 | 86.7 | 72.2 | 126.9 | 103.6 | 85.1 |
| 平均速度 V ($\mu l/min$) | 2.183 | 1.885 | 1.522 | 1.802 | 1.533 | 1.233 | 2.082 | 1.795 | 1.447 |

×, ※, ▲は夫々異なる大黒鼠を示す符号で、第1篇の表5の同一符号の示す大黒鼠と同一である。

V ($\mu l/min$) は 0'~30' 間の平均酸素吸収速度。

温度共幾分増強する傾向が時に存在し、最初の30分間が比較的直線に近い均一な吸収速度を示す事は、表1、表2において観取できる。

したがって、Vは0分~30分間の平均速度を採用した。すなわち10分、20分、30分目の酸素吸収量の総和を60分間に平均して算出したものである。

実験に供した8匹の大黒鼠の $38^\circ C$ におい

での酸素吸収速度はC. P. $1.5 \times 10^{-4}M$ の添加により、pH 変化を及ぼさず、表3に明らかのように対照に比し最低約17%から最高約31%におよぶ低下を示しており、かなりの動揺がみられ、これは主として個体差に基づくものと考えられる。

次に表1、表2に記載したVの対数を表示したものが表1', 表2' である。

表1', 表2' よりその $\log V$ を縦軸に、 $1/T$

表 3

| | Kontrol. | | Chlorp. $1.5 \times 10^{-4}M$ 添加 | | 低下率 |
|---|-------------|------|----------------------------------|-----|-----|
| | $\mu l/min$ | | $\mu l/min$ | Ca | Ca |
| ■ | 2.324 | 100% | 1.918 | 83% | 17% |
| □ | 2.495 | 100% | 2.037 | 82% | 18% |
| × | 2.732 | 100% | 2.183 | 80% | 20% |
| ● | 2.413 | 100% | 1.928 | 80% | 20% |
| ※ | 2.257 | 100% | 1.802 | 80% | 20% |
| ▲ | 2.683 | 100% | 2.082 | 78% | 22% |
| ○ | 2.158 | 100% | 1.685 | 78% | 22% |
| △ | 2.417 | 100% | 1.665 | 69% | 31% |

表 1' log V

| | 38°C | | 34°C | | 30°C | |
|---|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|
| | V | $\mu l/min$ | V | $\mu l/min$ | V | $\mu l/min$ |
| □ | V | 2.037 | V | 1.563 | V | 1.247 |
| | log V | 0.3090 | log V | 0.1940 | log V | 0.0959 |
| △ | V | 1.665 | V | 1.187 | V | 0.953 |
| | log V | 0.2214 | log V | 0.0745 | log V | -0.0210 |
| ■ | V | 1.918 | V | 1.471 | V | 1.257 |
| | log V | 0.2828 | log V | 0.1679 | log V | 0.0993 |
| ● | V | 1.928 | V | 1.442 | V | 1.145 |
| | log V | 0.2851 | log V | 0.1590 | log V | 0.0588 |
| ○ | V | 1.685 | V | 1.213 | V | 1.038 |
| | log V | 0.2266 | log V | 0.0839 | log V | 0.0162 |

表 2' log V

| | 38°C | | 36°C | | 32°C | |
|---|-------|-------------|-------|-------------|-------|-------------|
| | V | $\mu l/min$ | V | $\mu l/min$ | V | $\mu l/min$ |
| × | V | 2.183 | V | 1.885 | V | 1.522 |
| | log V | 0.3391 | log V | 0.2753 | log V | 0.1824 |
| ※ | V | 1.802 | V | 1.533 | V | 1.233 |
| | log V | 0.2558 | log V | 0.1912 | log V | 0.0910 |
| ▲ | V | 2.082 | V | 1.795 | V | 1.447 |
| | log V | 0.3185 | log V | 0.2541 | log V | 0.1605 |

この log V は少数第 5 位で 4 捨 5 入している。

を横軸に目盛つたものが図 1 であり、図 1 の夫々の点を縦軸にそい適当に移動して作図したものが図 2 である。(移動方法は図 2 に記載してある通りで、この図中に用いられた符号は表中に用いられたものと同一である。)

図 1 C.P. 1.5×10^{-4} 添加

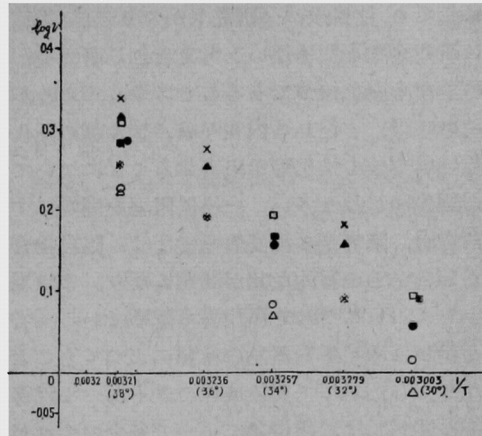
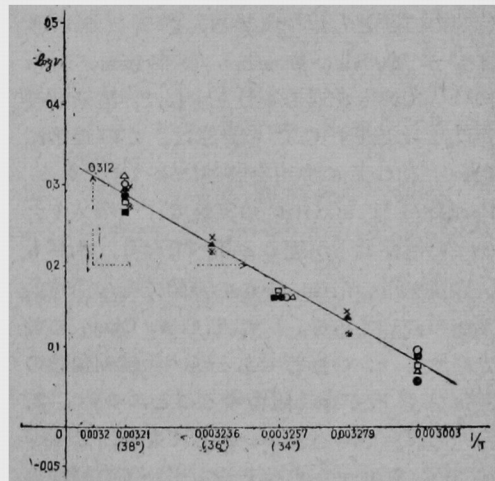


図 2 C.P. 1.5×10^{-4} 添加

■, ●, ○, △ は夫々この図の 34°C における ● の位置を基準として目盛つた。□ はこの図の 34°C の □ の位置を基準として目盛つた。×, ▲, ※ はこの図の 36°C の夫々の位置を基準として目盛つた。

$$\text{Slope} = \frac{0.112}{0.000048} \div 2333 \quad \mu = 2333 \times 4.58 \div 10700 \text{ cal}$$



(註) 図 2 において同じ高さに横に並んでいる諸点は同一の位置に重なるべきものを作図の都合上横に目盛つたものである。

図 2 に明らかなように μ の値を算出すると約 10700 cal. となる。

考 察

C.P. の臨床的評価が定まるにつれ、その作用機序の解明を終局の目標として、生化学的

研究が活潑に行われ、その目的達成に程遠いにしても、注目すべき研究もかなり多い。本篇の研究課題と関係深いと考えられる研究業績の主なものを拾つてみることにする。C. P. が脳の呼吸、すなわち内在呼吸、葡萄糖の酸化、焦性葡萄糖の酸化等を阻害することについての報告はかなり多い。一般に阻害を問題にする場合、阻害剤の濃度のみでなく、阻害物質と酵素系との量的な比が問題になり、この現象を C. P. について黒川等も認めている。また動物の種類酵素標品の種類によつてもことなる。したがつて実験条件の差もあつて阻害率に関しては、報告者によつて多少のずれが認められるが、わたくしの実験では C. P. 1.5×10^{-4} M の添加により、大黒鼠全脳ホモジネートの酸素吸収速度の低下率は約17%から約31%にわたつてをり、測定時間の後半において多少阻害率増強の傾向がみられるが、大体酸素吸収量は時間に対して直線形をとつている。これは実験条件もほぼ近似した塚本・佐竹等の成績と大体一致する。糖質代謝の主経路が Embden-Myerhob の Scheme から T. C. A. Cycle を通るものとすれば、酸素吸収速度におよぼす C. P. の影響は、この経路にたいする C. P. の作用を問題にすべきである。Bernsohn は *in vitro* の実験で、ヘキソキナーゼの活性低下が起ると述べてをり、八瀬も大黒鼠を用いた *in vivo* の実験でその活性低下を報告している。次に T. C. A. Cycle におよぼす C. P. の影響であるが、焦性葡萄糖の酸化を C. P. が強く阻害することについては、多くの研究者の意見が一致してをり、黒川等は T. C. A. Cycle の各基質を用いての実験で、C. P. 8×10^{-4} M 添加により、55%~76%の範囲で阻害の起ることを述べてをり、辻村は 3.3×10^{-4} M で 34%~48% (但琥珀酸の酸化は14%) 阻害すると報告している。Bernsohn 等は T. C. A. Cycle の各酵素系について C. P. の阻害をみ、オキサロ酢酸と焦性葡萄糖よりのクエン酸形成については、アセチル Co-A の形成を含めたこの縮合過程は比較的影響をうけることが少ないと述べ、 α -ケトグルタ

ール酸から琥珀酸への酸化は脳ホモジネートの場合、C. P. 10^{-3} M で35%阻害されるが、これも焦性葡萄糖の酸化が、脳ホモジネートで82%の阻害をみるのと較べて、かなり低いものであると述べている。つぎに脳ホモジネートの琥珀酸の酸化を Arsenite の存在下で観察し、 10^{-3} M の C. P. が 41% 阻害するとし、黒川等も同様に琥珀酸酸化の抑制を観察してをり、有岡等はマウスを用いての *in vivo* の実験で、組織化学的に琥珀酸脱水素酵素の活性低下を証明した。T. C. A. Cycle の電子伝達系であるチトクローム酸化酵素系に関しては、Bernsohn 等、Abood 等、黒川等、有岡等、田原等の研究があり、大体いずれも適当濃度の C. P. により、その活性の低下する事を報告してをり、黒川等はワールブルグ検圧法により脳チトクローム酸化酵素系の活性は 10^{-4} M 以下の低濃度の C. P. で軽度に促進され、それ以上の濃度では阻害される事を認め、琥珀酸脱水素酵素系には阻害作用のみで促進作用が認められず、両者の阻害形式がことなり、C. P. の琥珀酸酸化の阻害作用は、琥珀酸脱水素酵素系とチトクローム C 酸化酵素系の両者の阻害によるものであり、後者は前者に比べ阻害に対してより鋭敏であると述べている。他に C. P. が酸化と磷酸化を脱共軛するというデータ (Andrejew Abood 等)、ATP の ATPase による分解や、ATP の利用を抑制するというデータ (Grenell, Abood, Bernsohn 等) は注目に値するものである。以上述べたごとく Embden-Myerhob-Scheme, T. C. A. Cycle を通過する各過程の至る所に、いろいろな形と程度の C. P. の侵襲が想定されるわけであるが、本篇の実験成績は C. P. 1.5×10^{-4} M 添加にさいし、大黒鼠全脳ホモジネートの μ の値が約 10800 cal. であることを明らかにしてをり、これはその実験方法、算出方法の精密度を考慮すると、未添加の場合の μ の値 11000 ± 500 cal. と先ず同一と考えられ、その律速反応は未添加の場合と同一であると見做し得る。すなわちその経路の各所において、色々の程度の阻害をうけながらも、実験

条件のもとでは、酸素吸収速度を規定する律速反応は同一であると解釈することができる。而してその律速反応が何んであるかは、第1篇において考察したように、いまの所未定である。

結 論

わたくしは大黒鼠全脳ホモジネートの呼吸の活性化エネルギーに及ぼす、C. P. $1.5 \times 10^{-4} M$ 添加の影響を検討し、次のような結果を得た。

① C. P. $1.5 \times 10^{-4} M$ 添加により酸素吸収速度は約17%~31%の低下を示す。

② その活性化エネルギーは約 10800 cal. であり、未添加の場合と不変で、従つて律速反応は同一である。

稿を終るに臨んで御指導を賜つた故藤原教授、御指導並びに御校閲を賜つた奥村教授に深甚なる謝意を捧げると共に、高坂助教授の御助言と、実験に際し御協力を頂いた文部教官長田堯氏を始め教員諸士に、心よりの感謝を捧げるものである。

文 献

- 1) ワールブルグ検圧計：化学の領域増刊，昭29.
- 2) 藤田秋治著：医学生物学研究領域に於ける検圧法とその応用.
- 3) W. W. Umbreit., R. H. Burris., J. F. Stauffer: *Manometric Techniques and Tissue Metabolism*.
- 4) Fruton, Simonds 共著：生化学上，江上不二夫他4名共訳.
- 5) Felix, Haurowits 原著：生化学の進歩，鈴木達雄訳.
- 6) Arrhenius, S.: *Z. Physik. Chem.*, **4**, 226, 1889.
- 7) H. Eyring: *J. Chem. Physics*, **3**, 107, 1935.
- 8) H. Eyring and A. E. Stearn: *Chem. Revs.*, **24**, 253, 1939.
- 9) L. W. Sizer: *Advances in Enzymol.*, **3**, 35, 1943.
- 10) W. J. Crozier: *J. Gen. Physiol.*, **7**, 189, 1924.
- 11) Hoagland, H.: 1936a, *Am. J. Physiol.*, **116**, 604.
- 12) Hoagland, H.: *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.*, **4**, 267, 1936.
- 13) Hadidian, Z. and Hoagland, H.: *J. Gen. Physiol.*, **23**, 81, 1939.
- 14) Warburg, O.: *Inst. Internat. de Chimie Solvay, Paris, Gautier-Villard*, P. 303, 1935.
- 15) David, M., Greenberg: *Chemical Pathways of Metabolism*.
- 16) 陣内伝之助，森昭胤：日新医学，**44**, 243, 1957.
- 17) E. C. Slater: *Biochem. J.*, **46**, 495, 1950.
- 18) B. Chance: *Federation Proc.*, **110**, 171, 1951.
- 19) 生化学，第29巻，第2号，60, 1957.
- 20) B. C. Riggs: *J. Biol. Chem.*, **161**, 381, 1945.
- 21) 黒川正則，成瀬浩，加藤誠，羽場令人：精神神経誌，**59**, 20, 1957.
- 22) 佐竹郁夫，塚本隆三，野井透：医学と生物学，**40**, 102, 1956.
- 23) Bernsohn, J., Namajuska, I. and Cochrane, L. S. G.: *Arch. Biochem. Biophys.* **62**, 274, 1956.
- 24) 八瀬善郎：第59回近畿精神神経学会講演.
- 25) Tsujimura, Y.: *J. Nara Med. Assoc.* **7**, 25, 1956.
- 26) 有岡巖，谷向弘：精神神経誌，**59**, 32, 1957.
- 27) Abood, L. G.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **88**, 688, 1955.
- 28) 田原幸男，吉川博明，杉田英一郎：第53回日本精神神経学会講演.
- 29) Andrejew, A., Ducet, G., Louw, J. and Rosenberg, A. J.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **150**, 484, 1956.
- 30) Andrejew, A. and Rosenberg, A. J.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, **150**, 639.
- 31) Grenell, R. G., Mendelson, J. and Mc Elroy, W. D.: *Arch. Neurol. Psychiat.*, **73**, 347, 1955.
- 32) 柿本泰，中島久：薬学研究，**29**, 4, 346, 1957.

Activation Energy for Rat's Brain Tissue Respiration**III.****Influence of Chlorpromazin Addition on Activation Energy
for Respiration Enzym System of Untreated
Rat's Whole Brain Homogenate****By****Seigo Usui****Department of Neurology & Psychiatry, Okayama University Medical School
(Director: Prof. N. Okumura)**

The author studied the effects of chlorpromazin 1.5×10^{-4} M on the activation energy of respiration of whole brain homogenate of rats and obtained the results as follows: namely, by loading chlorpromazin 1.5×10^{-4} M the rate of oxygen absorption decreases about 17—31 per cent, but the activation energy has been found to be about 10,800 cal. This means that the value is the same as in the case without addition of chlorpromazin; and consequently the rate determining reaction is also identical.
